

令和元年6月17日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15052

研究課題名(和文)大腸菌の実験室進化とエピゲノム状態の解析による表現型メモリー機構の解明

研究課題名(英文) Understanding of the mechanism of phenotypic memory of E. coli by using experimental evolution and epigenomic analysis

研究代表者

堀之内 貴明 (Horinouchi, Takaaki)

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・研究員

研究者番号：60610988

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：生物システムは一般に、厳しい環境条件下においても表現型と遺伝子型を柔軟に変化させ、環境に適応することが可能である。こうした適応進化過程において、ゲノム遺伝子配列の変化を伴わないエピジェネティクス機構が重要な役割を果たすことが示唆されている。本研究ではエピジェネティクス機構に関わると予想される遺伝子群(核様体結合タンパク質:NAPs)の破壊が適応進化過程にどのような影響が生じるのかを詳細に解析し、その分子基盤を明らかにすることを目的とした。結果として、NAPsの一つであるLrpの破壊は、薬剤耐性化に有効な遺伝子変異を獲得できなくなることにより、適応進化の方向性に影響を及ぼすことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

適応進化過程の解明は進化生物学的な価値にとどまらず、生物進化を利用した応用研究にも大きな波及をもたらす。多剤耐性菌の出現が喫緊の課題となっている医学薬学分野においては、単に効果の大きい新薬の開発のみならず、耐性化そのものを抑制する方法が求められている。本研究の遂行は、その制御のための全く新たな手法の開発のための基盤となる知見をもたらす。

研究成果の概要(英文)：Biological systems possess the ability to adapt to environmental changes, which generate a variety of phenotypes and genotypes. In the author's previous study suggested that a part of the adaptive phenotypic changes are related to epigenetic mechanisms. However, it is entirely unclear how epigenetic mechanisms drive adaptive evolution. To clarify this point, the effect of nucleoid associated proteins (NAPs), which is expected to related to epigenetic mechanisms were analyzed. The results suggested that the disruption of Lrp affect the direction of evolution by the loss of acquire effective mutations.

研究分野：システムゲノム科学

キーワード：大腸菌 実験室進化 オミクス解析 エピゲノム 薬剤耐性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生物システムは一般に、厳しい環境条件下においても表現型と遺伝子型を柔軟に変化させ、環境に適応することが可能である。しかしながら、適応進化のプロセスにおいて表現型と遺伝子型とが具体的にどのようにからみ合いながら変化し、環境への適応がもたらされるかについては不明な点が多い。申請者らはこれまで、様々なストレス環境条件下で大腸菌の系統的な実験室進化(実験室内で世代を経させ、その間の変化を直接解析する実験)を行い、それらの環境に適応したストレス耐性大腸菌株の取得と解析を行ってきた(Horinouchi et al., BMC Evol. Biol., 15:180, 2015; Suzuki et al., Nature commun., 5, 5792, 2014)。その結果、表現型と遺伝子型とは必ずしも単純な対応関係にあるわけではなく、遺伝子型の変化のみでは説明が困難な表現型変化が存在することが示唆された。そこで、ゲノム遺伝子配列の変化を伴わない表現型メモリー機構として、DNA への修飾やゲノム立体構造などによるエピジェネティクス機構が適応進化過程に重要な役割を果たすと考え、その解明を目指して研究を行った。

2. 研究の目的

本研究では、エピジェネティクス機構に関わると考えられる遺伝子群(核様態結合タンパク質 Nucleoid associated protein; NAPs)ならびに DNA メチル化酵素の破壊が、適応進化過程にどのような影響が生じるかを、実験室進化およびオミクス解析により明らかにし、適応進化過程を担うエピゲノム状態変化を引き起こす関連要素の同定と分子基盤モデルの解明のための基盤情報の提供を目指す。そのために、上述の遺伝子群を破壊した株とそうでない株を、抗生物質存在環境での実験室進化に供して比較し、薬剤耐性能の変化を定量する。これにより破壊をすると薬剤耐性化が阻害されるような遺伝子を同定するとともに、オミクス解析によりその影響を網羅的に解析する。

3. 研究の方法

(1)さまざまな薬剤を用いた進化実験による薬剤耐性化阻害遺伝子の同定

4 種類の異なる作用機序の抗生物質(Ciprofloxacin; CPF, Cefixime; CFX, Amikacin; AMK, Chloramphenicol; CP)を用い、既知の NAPs および DNA メチル化酵素合計 10 遺伝子の破壊株を実験室進化に供した。こうした破壊株と元株とを複数回ずつ実験室進化に供し、破壊により薬剤耐性化が阻害されるような遺伝子を探索する。

(2)遺伝子型と表現型の対応関係の定量

上述で得られた、破壊されると薬剤耐性化が阻害されるような NAPs において全ゲノムリシーケンス解析を執り行い、進化実験において生じたゲノム変異を同定する。このようにして得た変異をゲノム編集により親株に導入することで、ゲノム変異によって説明される表現型変化とゲノム変異には依らない表現型変化の切り分けを行う。その後トランスクリプトーム解析と ChIP-seq 解析を行い、その差分から適応進化過程におけるエピゲノム状態に変化やそれに伴う転写状態の変化を定量する。

4. 研究成果

(1)さまざまな薬剤を用いた進化実験による薬剤耐性化阻害遺伝子の同定

親株ならびに既知の NAPs または DNA メチル化酵素の破壊株合計 11 株を、種類抗生物質 4 種類を添加した環境にて、各繰り返し実験数 10 系列ずつの実験室進化(11 × 4 × 10=440 系列)を実施した。これらの進化実験には、申請者らが開発した全自動培養システム(Horinouchi et al., J. Lab. Autom., 19, 478-482, 2014)を用いて執り行った。その結果、Lrp の破壊は、どの抗生物質に対する進化実験

においても耐性化の阻害をもたらした(図 1)。

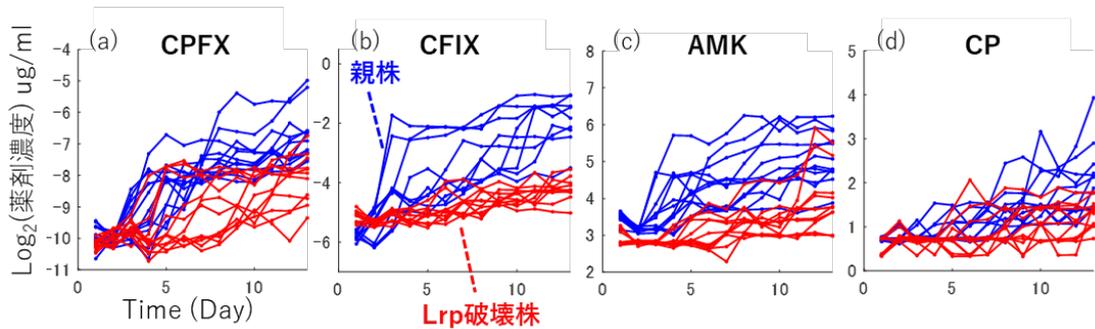


図 1: Lrp の破壊の薬剤耐性化に対する効果。(a)CFPX、(b)CFIX、(c)AMK、(d)CP のそれぞれの存在下で親株および Lrp 破壊株を 10 系列ずつ、14 日間の実験室進化に供したところ、Lrp 破壊は親株に比べ、薬剤耐性化が阻害された。

(2) 遺伝子型と表現型の対応関係の定量

上記の実験室進化によって得た耐性株のうち、CFIX に対して進化した株において生じた変異の同定を行った。Illumina MiSeq により進化前後の株の全ゲノムリシーケンス解析を行い、各株数個ずつの変異が同定された。このうちの 2 株を題材とし、同定された変異をゲノム編集技術により親株および Lrp 破壊株に導入し、ゲノム変異による表現型変化とゲノム変異に依らない表現型の切り分けを試みたところ、進化株で生じた表現型変化は全てゲノム変異によって説明された(図 2)。

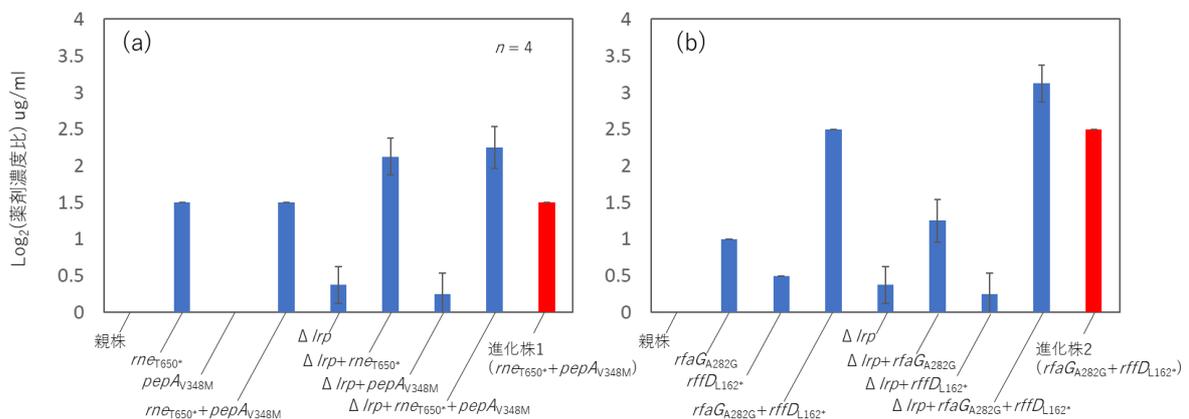


図 2: ゲノム編集による変異の薬剤耐性能への寄与。(a)は進化株 1 で同定された変異 (rne_{T650^*} , $pepA_{V348M}$)、(b)は進化株 2 で同定された変異 ($rfaG_{A282G}$ + $rffD_{L162^*}$)を、ゲノム編集によりそれぞれ親株および Lrp 破壊株に導入した際の薬剤耐性能の変化。親株と Lrp 破壊株の両方とも、全ての変異を導入すると進化株とほぼ同等の薬剤耐性能を獲得したことから、進化株において生じた表現型変化はこれらの変異により説明された。

一方で、Lrp 破壊株を CFIX 存在下で進化実験に供した場合についても全ゲノムリシーケンス解析を行ったところ、こうした有用変異は同定できなかった。このことから、Lrp 破壊株は何らかの理由により、薬剤耐性化に必要な変異を獲得することができず、そのために薬剤耐性化が阻害されていることが示唆された。そこで、Lrp 破壊株が有用な変異を獲得できなくなる理由として以下の 2 つの仮説を新たに設定し、その検証を行った。

Lrp 破壊は変異率の低下をもたらした

大腸菌を始めとする原核生物は、DNA 損傷に対し SOS 応答により error-prone 修復が誘導され、変異率が上昇し、この変異率の上昇がストレス環境下における進化の原動力の一つとなっている。この SOS 応答および error-prone 修復の活性に直接的または間接的に関与する遺伝子を破壊すると変

異率が低下することが知られている (Mamun et al., Science, 338, 1344-1348, 2012)。もし Lrp 破壊が変異率の低下をもたらす場合、Lrp 破壊株が有用な変異を獲得しにくくなると考えられる。そこで親株および Lrp 変異株の変異頻度を、リファンピシを含む寒天培地を用いた変異体の出現数を用いた測定法 (Luria et al., Genetics, 28, 491-511, 1943) により比較した。その結果、親株と Lrp 破壊株の変異頻度に差があるとはいえず (図 3)、この仮説は棄却された。

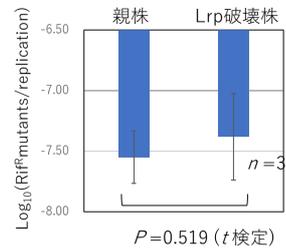


図 3: 親株と Lrp 破壊株の変異頻度の比較

Lrp 破壊によるゲノム構造の変化が変異発生のパターンの変化をもたらしたゲノム上には、変異が発生しやすい場所 (変異のホットスポット) やそうではない場所が存在すると考えられている。Lrp 破壊によるゲノム立体構造の変化が、こうしたホットスポットのパターンを変化させる可能性がある。たとえばゲノム上で DNA 結合タンパク質との複合体が形成されている箇所が DNA 損傷から保護されるとの報告 (Takata et al., PLoS One, 2013) や、転写状態と変異頻度との関係を示唆する報告 (Yoshikawa et al., J. Mol Bio., 2003; Paul et al., Nature, 2013) が存在する。そこで Lrp 破壊によるゲノム構造の変化と変異発生のパターンの変化との間の関係を解析した。大腸菌を変異蓄積実験に供して全ゲノムリシーケンス解析を行ったデータ (Shibai et al., Sci. Rep., 7, 14531, 2017) に基づき各ゲノム位置における変異数を定量した。ChIP-seq によって定量された Lrp のゲノム上における結合領域 (Kroner et al., J. Bacteriol., 201, 2019) の情報を用い、Lrp 結合部位近傍とそれ以外とで変異数を比較したところ、Lrp 近傍のほうが高い割合で変異が存在した (図 4)。

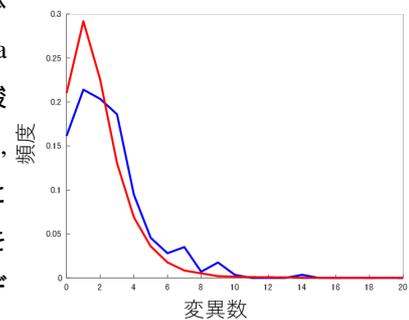


図 4: Lrp 結合領域の近傍 (青) およびそれ以外のゲノム領域 (赤) における単位塩基長あたりの変異数

これらの結果により、NAPs の一つである Lrp を破壊すると、薬剤耐性化に必要な変異を獲得できなくなり、薬剤耐性化が阻害されることが示唆された。また Lrp 破壊によるゲノム構造の変化が変異発生のパターンの変化を引き起こすことが示唆された。本研究では当初予定していたゲノム遺伝子配列の変化を伴わないエピジェネティクス機構に基づく表現型メモリー機構の分子基盤を明らかにするには至らなかったものの、ゲノム立体構造の変化と進化の方向性との関係を新たに見出した。こうした知見は、表現型と遺伝子型の複雑な関係性を紐解き、適応進化過程の理解と制御のための基盤となると期待される。

5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計 9 件)

Tomoya Maeda, Takaaki Horinouchi, Natsue Sakata, Aki Sakai, Chikara Furusawa. "High-throughput identification of the sensitivities of an Escherichia coli recA mutant strain to various chemical compounds", J. Antibiot., doi: 10.1038/s41429-019-0160-5, 2019. (査読有)

Takahiro Komori, Atsushi Shibai, Hiromi Saito, Yuya Akeno, Arnaud Germond, Takaaki Horinouchi, Chikara Furusawa, Saburo Tsuru. "Enhancement of K-strategy evolution in histidine utilization using a container with compartments", Genes to Cells, doi.org/10.1111/gtc.12640, 2018. (査読有)

Arno Germond, Taro Ichimura, Takaaki Horinouchi, Hideaki Fujita, Chikara Furusawa, Tomonobu

M. Watanabe. "Raman spectral signature reflects transcriptomic features of antibiotic resistance in Escherichia coli", *Communications Biology*, 1, 85, 2018. doi: 10.1038/s42003-018-0093-8. (査読有)

Takaaki Horinouchi, Tomoya Maeda, Chikara Furusawa. "Understanding and engineering alcohol-tolerant bacteria using OMICS technology", *World J Microbiol Biotechnol.*,34:157, 2018. doi: 10.1007/s11274-018-2542-4. (査読有)

Chikara Furusawa, Takaaki Horinouchi, Tomoya Maeda. "Toward prediction and control of antibiotic-resistance evolution", *Curr Opin Biotechnol.*, 54, 45-49, 2018. doi: 10.1016/j.copbio.2018.01.026. (査読有)

Kento Tokuyama, Yoshihiro Toya, Takaaki Horinouchi, Chikara Furusawa, Fumio Matsuda, Hiroshi Shimizu. "Application of adaptive laboratory evolution to overcome a flux limitation in an Escherichia coli production strain", *Biotechnol. Bioeng.*, 115, 6, 1542-1551, 2018. doi: 10.1002/bit.26568. (査読有)

Takaaki Horinouchi, Shingo Suzuki, Hazuki Kotani, Kumi Tanabe, Natsue Sakata, Hiroshi Shimizu, Chikara Furusawa. "Prediction of cross-resistance and collateral sensitivity by gene expression profiles and genomic mutations", *Sci. Rep.*, 7, 14009, 2017. doi: 10.1038/s41598-017-14335-7. (査読有)

Takaaki Horinouchi, Aki Sakai, Hazuki Kotani, Kumi Tanabe, Chikara Furusawa. "Improvement of isopropanol tolerance of Escherichia coli using adaptive laboratory evolution and omics technologies", *J. Biotechnol.*, 255, 47-56, 2017. doi: 10.1016/j.jbiotec.2017.06.408. (査読有)

Mari Yoshida, Sabrina Galiñanes Reyes, Soichiro Tsuda, Takaaki Horinouchi, Chikara Furusawa & Leroy Cronin. "Time-programmable drug dosing allows the manipulation, suppression and reversal of antibiotic drug resistance in vitro", *Nature Commun.*, 8:15589, 2017. doi: 10.1038/ncomms15589. (査読有)

[学会発表] (計 11 件)

堀之内貴明, "実験室進化による大腸菌の様々な環境への適応進化の解析とその応用", 酒類総合研究所理研 BDR セミナー, 東広島, 2019 年 3 月 1 日

堀之内貴明, "実験室進化による大腸菌の進化過程の理解とその利用", JST 植物関係領域合同若手研究会, 静岡, 2018 年 10 月 19 日

堀之内貴明, 前田智也, 古澤力, "大腸菌一遺伝子破壊株ライブラリの実験室進化による薬剤耐性化の解析", 生命科学系フロンティアミーティング 2018, 静岡, 2018 年 10 月 5,6 日

堀之内貴明, 前田智也, 小谷葉月, 酒井亜希, 古澤力, "大規模実験室進化を用いた転写因子の破壊による大腸菌の薬剤耐性化の制御", 日本生物工学会第 70 回大会, 大阪, 2018 年 9 月 7 日

堀之内貴明, "Biomek NXP を用いた全自動実験室進化による大腸菌の進化過程の解析とその応用", Biomek User Group Meeting Japan2017, 東京, 2017 年 12 月 14 日

堀之内貴明, 徳山健斗, 前田智也, 松田史生, 清水浩, 古澤力, "実験室進化により得られたメチルグリオキサール耐性大腸菌のマルチオミクス解析", 第 11 回メタボロームシンポジウム, 大阪, 2017 年 11 月 13 日

堀之内貴明, 前田智也, 古澤力, "実験室進化・オミックス解析・破壊株スクリーニングに基づく表現型メモリー機構の理解への試み", 生命情報科学若手の会第 9 回研究会, 蒲郡, 2017 年 10 月 7 日

堀之内貴明, 前田智也, 古澤力, "超大規模実験室進化とオミックス解析による大腸菌のストレス耐性機構の解析", 第 69 回生物工学会大会, シンポジウム「集え! バイオインフォマティクスを活用する生物学若手研究者」, 東京, 2017 年 9 月 12 日

堀之内貴明, 酒井亜紀, 小谷葉月, 田辺久美, 古澤力, "実験室進化と網羅的アプローチに基づく大腸菌のイソプロパノール耐性の解析" 2017 年度生物学若手研究者の集い夏のセミナー, 広島, 2017 年 7 月 22 日

堀之内貴明, 前田智也, 古澤力, "大腸菌実験室進化とオミックス解析を用いて大腸菌の適応進

化過程を解析する", NGS 現場の会第五回研究会, セッション「NGS とオミックス」, 仙台, 2017 年 5 月 23 日

堀之内貴明, "実験室進化による大腸菌の進化過程の解析とその応用", 不老社会実現に向けた進化学医学医療ワークショップ, 大阪, 2017 年 5 月 18 日

〔図書〕(計 2 件)

古澤力、前田智也、堀之内貴明、羊土社、実験医学別冊 あなたのラボに AI(人工知能) × ロボットがやってくる 研究に生産性と創造性をもたらすテクノロジー、2017 年、pp. 140 (pp. 112-115)

河野暢明、大上雅史、黒木健、堀之内貴明、羊土社、実験医学別冊 あなたのラボに AI(人工知能) × ロボットがやってくる 研究に生産性と創造性をもたらすテクノロジー、2017 年、pp 140 (pp. 54-57)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

https://researchmap.jp/takaaki_horinouchi/

<https://sites.google.com/site/takaakihorinouchi/>

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。